

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 octobre 2001 (18.10.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/77180 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 16/30, G01N 33/574

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/01094

(22) Date de dépôt international : 10 avril 2001 (10.04.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/04591 10 avril 2000 (10.04.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : BIO
MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : CHAR-
RIER, Jean-Philippe [FR/FR]; 8, chemin des Bruyères,
F-69130 Ecully (FR). JOLIVET-REYNAUD, Colette
[FR/FR]; 29, route Nationale, F-69720 Saint Bonnet de
Mure (FR). MICHEL, Sandrine [FR/FR]; 4, rue Verdi,
F-69001 Lyon (FR).

(74) Mandataire : TONNELIER, Jean-Claude; Nony &
Associés, 3, rue de Penthievre, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 01/77180 A1

(54) Title: NOVEL ANTIBODIES SPECIFICALLY IDENTIFYING INACTIVE PSA, AND USES THEREOF

(54) Titre : ANTICORPS RECONNAISSANT SPECIFIQUEMENT LE PSA INACTIF, ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns antibodies capable of identifying the prostate specific antigen (PSA) in non-complexed and inactive form, and their uses in methods for diagnosing an adenocarcinoma or benign prostatic hyperplasia.

(57) Abrégé : Anticorps capables de reconnaître l'antigène spécifique de la prostate (PSA) sous forme non complexée et inactive, et leurs applications dans des méthodes de diagnostic d'un adénocarcinome ou d'une hyperplasie bénigne de la prostate.

ANTICORPS RECONNAISSANT SPECIFIQUEMENT LE PSA INACTIF, ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention se rapporte à des anticorps ou fragments d'anticorps qui se lient spécifiquement à l'antigène spécifique de la prostate (ou PSA, pour Prostate Specific Antigen) sous sa forme libre inactive, ainsi qu'aux hybridomes produisant de tels anticorps.

La présente invention se rapporte également à des réactifs pour tests immunologiques contenant de tels anticorps ainsi qu'à des tests immunologiques comprenant la mise en œuvre de tels réactifs.

La présente invention se rapporte en outre à une méthode de diagnostic d'un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint d'une telle pathologie.

La présente invention se rapporte également à une méthode de diagnostic permettant de différencier entre une pathologie bénigne de la prostate et un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint d'une de ces maladies.

La présente invention se rapporte enfin au kit de diagnostic permettant de diagnostiquer un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint d'un adénocarcinome ou permettant de différencier entre une pathologie bénigne de la prostate et un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint par une de ces maladies.

Le PSA est produit par l'épithélium glandulaire de la prostate humaine, probablement sous une forme zymogène inactive (Lundwall *et al.* FEBS Lett 1987), et est sécrété dans le liquide séminal sous sa forme active (Lilja, J. Clin Invest 1985). L'activité biologique du PSA dans le liquide séminal est liée à sa fragmentation protéolytique limitée des protéines prédominantes sécrétées par les vésicules séminales (Lilja, J. Clin Invest 1985 ; Lilja *et al.* J. Clin Invest 1987 ; Mc Gee *et al.* Biol. reprod. 1988).

Le PSA est le principal marqueur du cancer de la prostate qui affectera, au cours de sa vie, un homme sur six en Occident. Cette protéase de la famille des kallikréines, principalement sécrétée par l'épithélium prostatique, est retrouvée à une concentration de 0,5 à 5 mg/ml dans le liquide séminal et à une concentration un million de fois moindre dans le sérum d'un patient. Ainsi, le PSA est trouvé normalement à une concentration inférieure à 2,5 ng/ml dans le sérum. Cependant, cette concentration augmente en

principe notablement lors d'un cancer de la prostate et modérément lors d'altérations bénignes telles que l'hypertrophie de la prostate bénigne (BPH) ou la prostatite aiguë.

La séquence protéique du PSA a été déterminée. Il s'agit d'une glycoprotéine comportant 237 acides aminés ("Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA". Lundwall A., Lilja H., 1987. *FEBS Lett* 214 : 317-322).

Il a été proposé une méthode de diagnostic consistant à mesurer la concentration en PSA sérique et à la comparer à une valeur-seuil qui est de 4 ng/ml. Toutefois, on a constaté que cette méthode de diagnostic conduit à suspecter à tort trois patients sur quatre ce qui est préjudiciable. De plus, cette méthode ne permet pas de diagnostiquer 30 à 45% des cas de cancers confinés à la glande, ce qui constitue pourtant un stade précoce de la maladie potentiellement curable dont le diagnostic serait donc particulièrement souhaitable. Le caractère peu satisfaisant de cette méthode est d'ailleurs démontré par l'étude rapportée dans l'article "Prostate Cancer Detection in Men With Serum PSA Concentrations of 2.6 to 4.0 ng/ml and Benign Prostate Examination", Catalona *et al.*, *JAMA*, 14 Mai 1997 – Vol. 277, No. 18, qui montre que la valeur-seuil doit être inférieure à 4 ng/ml pour dépister précocement un cancer de la prostate.

Par ailleurs, il a été montré récemment que dans le sérum, le PSA s'associe à des inhibiteurs de protéase, tels que l' α -1-antichymotrypsine (ACT), et l' α -2 macroglobuline (A2M). Ces associations entraînent l'inactivation de l'activité chymotrypsique du PSA, comme cela a été démontré dans l'article "Enzymatic activity of prostate specific antigen and its reactions with ultracellular serine proteinase inhibitors" A. Christensson, C.B. Laurell, H. Lilja, 1990 *Eur. J. Biochem* 194 : 755-763. L'usage du ratio PSA libre sur PSA total a alors été proposé afin d'améliorer la spécificité du diagnostic.

Ainsi, la demande de brevet WO-A-97/12245 décrit une méthode permettant de diagnostiquer un adénocarcinome de la prostate sans biopsie. Cette méthode consiste à mesurer, dans le sérum ou dans le sang des patients, la quantité totale de PSA. Si cette valeur est comprise entre 2,5 et 20 ng/ml, on mesure également la concentration de PSA libre. On calcule ensuite le ratio PSA libre sur PSA total. Si ce ratio est inférieur à 7%, le diagnostic s'oriente vers un adénocarcinome de la prostate.

Toutefois, l'utilisation d'un seuil à 7%, pour le diagnostic d'un cancer de la prostate, est controversée par de nombreux auteurs, comme le montre la publication de Lein *et al.* "Relation of free PSA/total PSA in serum for differentiating between patients

with prostatic cancer and benign prostate hyperplasia : which cutoff should be used ?". Dans ce document publié dans la revue Cancer Investigation, 16(1), 45-49, 1998, il a été démontré qu'il est difficile, par le biais de ce ratio, de différencier systématiquement un cancer de la prostate d'une BPH.

5 Pour ces raisons, la demanderesse s'est intéressée dans une demande de brevet WO-A-00/02052, déposée sous priorité du 3 Juillet 1998, à la présence dans le sérum de forme clivée du PSA. Les formes moléculaires de PSA sérique de patients atteints de cancer ou de BPH ont été cartographiées par électrophorèse bidimensionnelle, associée à une détection par chimioluminescence, afin d'observer l'ensemble des formes de PSA
10 c'est-à-dire les formes libres, complexées et clivées.

Les profils d'électrophorèse de sérums de sujets atteints d'adénocarcinome de la prostate sont relativement homogènes, présentant essentiellement la forme non clivée du PSA, tandis que ceux de sujets atteints de BPH peuvent comporter une proportion relativement importante de forme clivée et des spots légèrement plus basiques sans forme
15 clivée. L'augmentation du ratio PSA libre sérique sur PSA total sérique observé chez les patients atteints de BPH serait donc essentiellement liée à l'existence de PSA clivé, qui pourrait être enzymatiquement inactif et donc incapable de se lier à l'ACT ainsi qu'à la présence d'une forme de PSA libre légèrement plus basique que la forme PSA libre active, qui pourrait correspondre à la forme zymogène, inactive, du PSA.

20 En fonction de ces observations, la demanderesse a décrit des méthodes de diagnostic d'adénocarcinome de la prostate comprenant la quantification, après séparation par électrophorèse bidimensionnelle, du PSA libre clivé et/ou non clivé et l'utilisation de ces valeurs afin d'établir un diagnostic.

Toutefois, ces méthodes requièrent la mise en œuvre d'électrophorèse bidimensionnelle. Elles sont par conséquent assez coûteuses et nécessitent beaucoup de
25 temps de manipulation.

On a maintenant découvert qu'il était possible de disposer de méthodes de diagnostic d'adénocarcinomes de la prostate ne présentant pas les inconvénients précités et disposant d'une excellente spécificité et sensibilité par l'utilisation de réactifs immu-
30 nologiques. On a en effet découvert qu'il est possible d'obtenir des anticorps dirigés spécifiquement contre le PSA libre inactif. On a également découvert que de tels anticorps peuvent être avantageusement utilisés notamment dans des méthodes de diagnostic du

cancer de la prostate et du BPH.

La présente demande a ainsi pour objet des anticorps ou fragments d'anticorps qui se lient spécifiquement au PSA libre inactif, lesdits anticorps étant des anticorps polyclonaux purifiés ou des anticorps monoclonaux.

5 Par fragments d'anticorps, on entend en général dans la présente demande, tout fragment d'anticorps ayant conservé la spécificité de l'anticorps d'origine et en particulier des fragments de type Fab et F(ab')₂. Dans la présente demande, le mot "anticorps" désigne par la suite également des fragments d'anticorps lorsque le sens le permet.

10 Par l'expression "anticorps se liant spécifiquement à une forme donnée de PSA", on désigne bien entendu un anticorps qui se lie essentiellement à ladite forme de PSA. Par exemple, le produit qui se trouve lié à l'anticorps est constitué d'au moins 80 %, et de préférence d'au moins 90 %, de ladite forme de PSA.

15 Par "PSA libre inactif", on entend dans la présente demande une forme libre du PSA, c'est-à-dire non complexée, autrement dit non associée à ses inhibiteurs tels que l'ACT. De plus, cette forme libre est inactive. Par le terme "inactif", on désigne une forme de PSA qui présente une activité protéolytique (en particulier de type chymiotrypsique) nettement inférieure à celle du PSA libre présent dans le sérum de sujets sains, par exemple inférieure d'au moins 80% ou davantage.

20 La présente invention a notamment pour objet des anticorps ou des fragments d'anticorps monoclonaux qui se lient spécifiquement au PSA libre inactif.

La présente invention a également pour objet les hybridomes produisant des anticorps monoclonaux tels que définis précédemment.

25 L'obtention d'hybridomes est bien connue et ne sera pas rappelée ici. On sélectionne les hybridomes qui reconnaissent spécifiquement le PSA libre inactif, comme indiqué ci-après. On a découvert que certains clones produisaient des anticorps qui, fixés sur une colonne de chromatographie, ne retenaient qu'une fraction du PSA total sérique de différents individus, et que cette fraction était, avec certains de ces anticorps, une forme libre et sensiblement inactive (telle que définie précédemment) du PSA.

30 Par ailleurs, on a constaté que les fractions de PSA non retenues par ces anticorps contenaient encore du PSA libre et avaient conservé pratiquement toute l'activité protéolytique du sérum de départ.

On a pu obtenir ainsi des fractions enrichies en PSA libre inactif qui ont servi

ensuite à tester systématiquement des clones d'hybridomes obtenus comme précédemment.

Parmi les hybridomes obtenus après immunisation de souris avec du PSA d'origine séminale commercialisé par la société SCIPAC, on a constaté qu'environ 1,5% produisaient des anticorps se liant spécifiquement au PSA libre inactif ainsi obtenu.

La présente invention a également pour objet un réactif pour test immunologique contenant des anticorps ou fragments d'anticorps tels que définis précédemment.

Dans les réactifs selon l'invention, les anticorps ou fragments d'anticorps se liant spécifiquement au PSA libre inactif peuvent être utilisés tels quels ou bien notamment sous forme fixés sur un support solide et/ou liés à un marqueur.

La fixation d'anticorps ou de fragments d'anticorps sur un support solide est bien connue. Le support peut être réalisé avec tout matériau solide, biologique ou synthétique, doué de propriétés adsorbantes ou capables de fixer un agent de couplage. Des matériaux sont connus et décrits dans la littérature. Parmi les matériaux solides capables de fixer les anticorps par adsorption, on citera par exemple le polystyrène, le polypropylène, les latex, etc. Parmi les matériaux permettant de fixer les anticorps par covalence à l'aide d'un agent de couplage, on peut citer notamment le dextran, la cellulose, etc. Le support peut se présenter par exemple sous forme de disques, de tubes, de billes ou de plaques, en particulier de plaques de microtitrage.

La liaison d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps à un marqueur, qu'il soit radioactif, enzymatique, coloré ou de tout autre type communément utilisé dans des techniques immunologiques, est bien connue et décrite dans la littérature.

La présente invention a en outre pour objet un test immunologique pour la détermination quantitative du PSA libre inactif, dans un échantillon biologique prélevé chez un sujet, dans lequel on met en contact ledit échantillon avec un réactif tel que défini précédemment et l'on évalue la quantité de PSA libre inactif lié aux anticorps du réactif.

L'échantillon biologique prélevé chez le sujet, est généralement un échantillon de sang ou de sérum. Si désiré, il peut bien entendu avoir subi une étape de concentration ou de dilution préalablement à sa mise en contact avec le réactif contenant des anticorps ou fragments d'anticorps se liant spécifiquement au PSA libre inactif.

La quantification du PSA libre inactif lié auxdits anticorps ou fragments d'anticorps peut être réalisée de différentes manières bien connues.

Par exemple, la quantité de PSA libre inactif peut être évaluée par des tests de type sandwich. Selon un mode de réalisation particulier, on met en contact un réactif pour test immunologique, dans lequel les anticorps ou fragments d'anticorps se liant spécifiquement au PSA libre inactif sont fixés sur le support, avec l'échantillon biologique dont on souhaite déterminer la teneur en PSA libre inactif, puis après lavage l'on met en contact ledit support avec un second anticorps marqué se liant au PSA. Après un nouveau lavage, on mesure la quantité de marqueur fixé et on en déduit la teneur en PSA libre inactif par comparaison avec une courbe étalon établie préalablement.

Selon un autre mode de réalisation des tests immunologiques de l'invention, on évalue en outre la quantité d'une forme de PSA autre que la forme libre inactive présente dans un échantillon de même nature prélevé chez le même sujet.

Par l'expression "échantillon de même nature prélevé chez le même sujet", on entend soit deux fractions d'un même prélèvement, soit deux échantillons issus de deux prélèvements différents mais qui doivent être de même nature, par exemple des échantillons sériques.

Bien entendu, lorsque les quantités mesurées sont destinées à être comparées, il convient que ces valeurs soient comparables. En d'autres termes, il convient que les valeurs mesurées soient rapportées à une même dilution ou concentration éventuelle de l'échantillon ainsi qu'à un même volume.

Les formes autres que la forme libre inactive du PSA sont notamment le PSA complexé, le PSA libre total, le PSA libre actif et le PSA total, c'est-à-dire l'ensemble des formes actives ou inactive, libres ou complexées, du PSA.

Le dosage de chacune de ces différentes formes notamment à l'aide d'anticorps spécifiques, est connu.

Le PSA complexé est dosé par exemple à l'aide d'anticorps décrits dans la demande de brevet WO-A-98/22509.

Le PSA total est dosé par exemple à l'aide d'anticorps décrits par H. Nagasaki et al. (1999), Clin. Chem. 45 : 4486-496.

Le PSA libre est dosé par exemple à l'aide d'anticorps décrits dans la demande de brevet WO 92/01936, ou à l'aide d'anticorps monoclonaux commercialisés par CHUGAI (Japon).

La présente invention a en particulier pour objet un test immunologique tel

que défini précédemment dans lequel on dose en outre le PSA libre actif. La quantité de PSA libre actif peut être évaluée de différentes manières.

Ainsi, selon un premier mode de réalisation, la quantité de PSA libre actif est évaluée à l'aide d'anticorps se liant spécifiquement au PSA libre actif qui peuvent être obtenus par immunisation à l'aide de fractions de PSA total ou de fractions enrichies en PSA libre actif. La quantité de PSA libre actif peut être également évaluée de façon indirecte par évaluation de la quantité de PSA libre total, de laquelle on soustrait la quantité de PSA libre inactif déjà évaluée comme précédemment.

La présente invention a en outre pour objet un test immunologique pour déterminer le rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre total,

ou le rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre actif,

ou le rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA libre total,

ou le rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA total,

ou le rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA complexé,

ou le rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA total,

ou le rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA complexé,

ou les inverses de ces rapports, ou des combinaisons de ces rapports,

dans un échantillon biologique prélevé chez un sujet, dans lequel :

- on évalue la quantité de PSA libre inactif dans un échantillon biologique prélevé chez un sujet, en mettant en contact ledit échantillon avec un réactif selon l'invention tel que défini précédemment,

- on évalue l'une des quantités choisies parmi la quantité de PSA libre actif, la quantité de PSA libre total, la quantité de PSA total et la quantité de PSA complexé, sur un échantillon de même nature prélevé chez le même sujet, et

- on détermine ledit rapport ou ledit rapport inverse, ou ladite combinaison de rapports.

La présente invention concerne différentes méthodes de diagnostic qui, de façon générale, s'appliquent à des sujets présentant une concentration sérique en PSA supérieure à 2 ng/ml ou à 2,5 ng/ml.

La présente invention a également pour objet une méthode de diagnostic d'un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint dudit adénocarcinome, sans pratiquer de biopsie, dans laquelle on met en œuvre un ou plusieurs tests immunologiques tels que définis ci-dessus.

5 On a en effet découvert que la concentration (par exemple sérique) en PSA libre inactif est nettement plus élevée dans le cas d'une BPH que dans celui d'un adénocarcinome de la prostate.

L'invention concerne donc notamment une méthode de diagnostic de la BPH ou de différenciation entre un cancer de la prostate et une BPH, dans laquelle on mesure
10 la teneur en PSA libre inactif dans un échantillon provenant d'un individu, et on compare cette teneur à une échelle de valeurs prédéterminées, lesdites valeurs étant celles observées chez les patients affectés par une BPH reconnue et celles observées chez les patients affectés par un adénocarcinome de la prostate reconnu, et on conclut du résultat de cette comparaison soit à la présence d'une BPH soit à la présence d'un adénocarcinome de la
15 prostate. Cette méthode revient en pratique à comparer la valeur mesurée à une valeur-seuil.

Bien entendu, ces variations de la teneur en PSA libre inactif influencent différents rapports tels que des rapports de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre total ou à la quantité de PSA total. On peut encore déterminer d'autres rapports,
20 comme cela sera précisé ci-après.

On sait que, de façon générale, les résultats des tests immunologiques dépendent en grande partie des caractéristiques de spécificité et d'affinité des anticorps utilisés, et que ces caractéristiques influent sur les valeurs mesurées avec ces anticorps. On conçoit donc qu'il n'est pas possible de donner des valeurs-seuils précises et que des va-
25 leurs-seuils adaptées à chaque anticorps utilisé peuvent être déterminées dans chaque cas par de simples expériences de routine.

Il faut bien comprendre que l'on appelle ici valeur-seuil soit une valeur discrète soit un intervalle de valeurs correspondant à une zone d'indétermination. Bien évidemment, lorsque la valeur mesurée est incluse dans l'intervalle d'indétermination, ou est
30 très proche de la valeur-seuil dans le cas d'une valeur discrète, on ne peut pas conclure définitivement et il convient de conduire des investigations supplémentaires.

Bien entendu, quand on a déterminé une valeur-seuil pour un type de rapport

donné, on peut en déduire des valeurs-seuils correspondant à d'autres types de rapports.

La présente invention a notamment pour objet une méthode de diagnostic telle que définie précédemment, dans laquelle, en outre, on compare la valeur du rapport ainsi déterminée à une valeur-seuil prédéterminée choisie, selon le type de rapport utilisé, de façon que les valeurs dudit rapport supérieures ou, respectivement, inférieures, à ladite valeur-seuil soient représentatives des valeurs observées chez les patients affectés par un adénocarcinome de la prostate reconnu, et de façon qu'inversement les valeurs dudit rapport inférieures ou, respectivement, supérieures, à ladite valeur-seuil soient représentatives des valeurs observées chez les sujets reconnus comme n'étant pas affectés par un adénocarcinome de la prostate, et l'on conclut du résultat de ladite comparaison soit à la présence soit à l'absence d'un adénocarcinome de la prostate.

La présente invention a également pour objet une méthode de diagnostic permettant de différencier entre une pathologie bénigne de la prostate et un adénocarcinome de la prostate, chez un sujet soupçonné d'être atteint par l'une de ces maladies dans laquelle on met en œuvre un test immunologique tel que défini précédemment.

La présente invention a en particulier pour objet une telle méthode dans laquelle, en outre, on compare la valeur d'un des rapports mentionnés précédemment à une valeur de différenciation prédéterminée choisie, selon le type de rapport utilisé, de façon que les valeurs dudit rapport qui sont supérieures ou, respectivement, inférieures, à ladite valeur de différenciation soient représentatives des valeurs observées chez les patients affectés par une pathologie bénigne de la prostate reconnue, et de façon qu'inversement les valeurs dudit rapport qui sont inférieures ou, respectivement, supérieures, à ladite valeur de différenciation soient représentatives des valeurs observées chez des sujets reconnus comme étant affectés par l'adénocarcinome de la prostate reconnu, et l'on conclut du résultat de ladite comparaison soit à la présence d'une pathologie bénigne de la prostate soit à la présence d'un adénocarcinome de la prostate.

En pratique, les valeurs de différenciation, sont analogues aux valeurs-seuils discutées ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet une méthode de diagnostic d'un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint dudit adénocarcinome, dans laquelle :

- on détermine la quantité de PSA libre actif et/ou la quantité de PSA libre

inactif dans un échantillon prélevé chez ce sujet,

- le cas échéant, on détermine la quantité d'une forme de PSA autre que le PSA libre actif et autre que le PSA libre inactif dans un échantillon de même nature prélevé chez le même sujet,

- 5 - on détermine la valeur de l'un des rapports suivants :

- rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre actif,
- rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre total,
- rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA total,
- rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA complexé,
- 10 • rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA libre total,
- rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA total,
- rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA complexé,

- 15 ou les inverses de ces rapports, ou des combinaisons de ces rapports,
- on compare la valeur du rapport ainsi déterminée à une valeur-seuil pré-déterminée choisie, selon le type de rapport utilisé, de façon que les valeurs dudit rapport supérieures ou, respectivement, inférieures, à ladite valeur-seuil soient représentatives des valeurs observées chez les patients affectés par un adénocarcinome de la prostate reconnu, et de façon qu'in-
 - 20 versement les valeurs dudit rapport inférieures ou, respectivement, supérieures, à ladite valeur-seuil soient représentatives des valeurs observées chez des sujets reconnus comme n'étant pas affectés par un adénocarcinome de la prostate et l'on conclut du résultat de ladite comparaison soit à la présence soit à l'absence d'un adénocarcinome de la prostate.

- 25 La présente invention a en outre pour objet une méthode de diagnostic permettant de différencier entre une pathologie bénigne de la prostate et un adénocarcinome de la prostate, chez un sujet soupçonné d'être atteint d'une de ces maladies, dans laquelle :

- on détermine la quantité de PSA libre actif et/ou la quantité de PSA libre inactif dans un échantillon prélevé chez ce sujet,
- le cas échéant, on détermine la quantité d'une forme de PSA autre que le
- 30 PSA libre actif et autre que le PSA libre inactif dans un échantillon de même nature prélevé chez le même sujet,
- on détermine la valeur de l'un des rapports suivants :

- rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre actif,
 - rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre total,
 - rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA total,
 - rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA complexé,
 - 5 • rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA libre total,
 - rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA total,
 - rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA complexé,
- ou les inverses de ces rapports, ou des combinaisons de ces rapports,
- on compare la valeur du rapport ainsi déterminée à une valeur de différen-
- 10 ciation prédéterminée choisie, selon le type de rapport utilisé, de façon que les valeurs dudit rapport sont supérieures ou, respectivement, inférieures, à ladite valeur de différenciation soient représentatives des valeurs observées chez les patients affectés par une pathologie bénigne de la prostate reconnue, et de façon qu'inversement les valeurs dudit rapport qui sont inférieures ou,
- 15 respectivement, supérieures, à ladite valeur de différenciation soient représentatives des valeurs observées chez des sujets reconnus comme étant affectés par un adénocarcinome de la prostate reconnu, et l'on conclut du résultat de ladite comparaison soit à la présence d'une pathologie bénigne de la prostate soit à la présence d'un adénocarcinome de la prostate.
- 20 La présente invention a encore pour objet un kit de diagnostic permettant de diagnostiquer un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint dudit adénocarcinome, ou permettant de différencier entre une pathologie bénigne de la prostate et un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint par l'une de ces maladies, ledit kit comprenant :
- 25 - des moyens pour doser le PSA libre inactif dans un échantillon biologique,
- des moyens pour doser le PSA libre actif dans un échantillon biologique de même nature, et éventuellement
- des moyens pour doser une forme de PSA autre que le PSA libre inactif et
- 30 autre que le PSA libre actif dans un échantillon biologique de même nature.

Parmi les moyens utilisables dans ledit kit, on utilise en particulier des anti-

corps se liant spécifiquement à la forme de PSA que l'on souhaite quantifier.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

Exemple 1 : Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux

Production d'anticorps monoclonaux se liant à la PSA

5 Des souris femelles BALB/c JYCo, âgées de 4 à 6 semaines (IFFA Credo) sont immunisées par injection intrapéritonéale avec 15 µg de PSA purifié (PSA d'origine séminale fournie par SCIPAC) émulsifiées avec un volume égal d'adjuvant complet de Freund, suivi par cinq injections d'adjuvant incomplet, les injections étant espacées de deux semaines. Quatre jours après la dernière injection, les cellules de la rate sont préle-
10 vées et fusionnées, selon la méthode de Köhler et Milstein, avec des cellules de la lignée cellulaire de myélome de souris Sp 2/0-Ag14. Puis les cellules sont mises en culture pendant 12 à 14 jours. Les surnageants des cultures sont récupérés puis soumis à un test selon une méthode ELISA dans laquelle la phase solide est revêtue avec l'antigène utilisé pour l'immunisation. Les colonies positives c'est-à-dire réagissant positivement vis-à-vis du
15 PSA, sont sous-clonées deux fois par dilution limite. On cultive des clones sélectionnés en ascites de façon connue. La fraction IgG de chaque fluide ascitique est purifié par chromatographie sur colonne protéine A-Sépharose 4 FF, selon les instructions du fabricant (PHARMACIA).

20 **Exemple 2 : Détermination de la spécificité des anticorps monoclonaux vis-à-vis des formes libre, complexée et totale du PSA**

Des plaques à 96 puits (Nunc) sont revêtues avec 100µl d'une solution comprenant 1 mg/L de PSA non complexé (fournie par SCIPAC), de complexe PSA-ACT (fourni par les Laboratoires SCRIPPS) ou d'ACT (également fourni par les Laboratoires SCRIPPS) dans 0,05 mol/L de tampon carbonate, PH 9,6. Après incubation pendant une
25 nuit à température ambiante, les plaques sont lavées trois fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS ; 50 mmol/L tampon phosphate, PH 7,2, 150 mmol/L NaCl) contenant 0,5 ml/L de Tween 20 (PBS-T), et bloquée pendant 1 heure à 37°C avec du PBS contenant 10 g/L d'extrait de lait lyophilisé. Puis les plaques sont lavées une seconde fois avec du PBS-T. On ajoute dans chaque puits de chaque plaque 100 µl de
30 fluide ascitique dilué de 10^{-1} à 10^{-6} dans du PBS-T, puis on incube pendant une heure à 37°C. On lave ensuite les plaques avec du PBS-T, et on ajoute dans chaque puits de chaque plaque 100 µl d'IgG de chèvre anti-souris conjugué à de la phosphatase alcaline

(Jackson ImmunoResearch Laboratories) à une dilution de 1:2000 dans du PBS-T contenant 10 g/L d'albumine sérique bovine (BSA) ; (SIGMA). On incube les plaques pendant une heure à 37°C puis on les lave avec du PBS-T.

5 Le substrat, une solution de p-nitrophényl-phosphate (SIGMA) est ajoutée pendant 30 minutes. L'activité enzymatique est bloquée avec une solution de NaOH à 1 mol/L et l'absorbance est mesurée à 405 nm avec un lecteur de plaques ELISA (BioMérieux).

On a ainsi pu sélectionner plusieurs anticorps qui reconnaissent le PSA libre, mais qui ne reconnaissent ni le PSA complexé, ni l'ACT.

10 **Exemple 3 : Caractérisation de la spécificité vis-à-vis des formes inactive et active du PSA**

Afin de poursuivre la caractérisation de la spécificité des anticorps, on a préparé du PSA présentant les caractéristiques souhaitées.

15 Ainsi, on fait synthétiser du PSA par la lignée cellulaire LNCaP selon la technique décrite dans les articles "LNCaP Produces both putative zymogen and inactive, free form of prostate specific antigen" E. Corey et al., 1998, Prostate 35:135-143, "Androgen-Sensitive human prostate cancer cell, LNCaP, Produce both N-terminaly mature a, d truncated prostate specific antigen isoform" A. Herrala et al., 1997, Eur. J. Biochem. 255:329-335, "Production of miligram concentration of free prostate specific antigen (fPSA) from LNCaP cell culture : Difference between fPSA from LNCaP cell and seminal plasma." J. T. Wu et al., 1998, J. Clin. Lab. Anal. 12 : 6-13.

20 Le PSA ainsi produit par la lignée cellulaire LNCaP est composé de PSA zymogène, de PSA mature enzymatiquement actif, de PSA entier inactif ainsi que de formes clivées ou tronquées inactives du PSA.

25 De plus, la culture de la lignée est réalisée en présence de sérum de veau fœtal, qui contient de l'ACT, une proportion de complexe PSA-ACT étant ainsi également présente. Ce PSA d'origine cellulaire est donc un bon outil pour mettre en évidence la spécificité de reconnaissance des différents anticorps monoclonaux anti-PSA libre obtenus à l'exemple 2.

30 Des cellules LNCaP sont mises en culture dans un milieu synthétique auquel a été rajouté du sérum de veau fœtal. Les différents surnageants de culture contenant le PSA sécrété, sont rassemblés, divisés en fractions identiques de 380 ml.

Des immunoabsorbants sont réalisés en couplant de façon identique des anticorps monoclonaux anti-PSA obtenus à l'exemple 2 sur résine de sépharose. On forme ainsi des colonnes d'affinité contenant des quantités de résine identiques. Chaque fraction de PSA cellulaire est immunopurifiée sur une de ces colonnes d'affinité, et le PSA fixé par chaque anticorps monoclonal est élué de la colonne, d'abord par une solution acide (glycine 0,1 M et pH 2,8), puis par une solution basique (DEA 0,1 M et pH 11). Les éluats sont ensuite immédiatement neutralisés pour préserver l'activité du PSA.

Le PSA contenu dans les différentes fractions obtenues est analysé : après avoir été quantifié, son activité enzymatique est mesurée. Puis les différentes formes de PSA contenues dans les éluats sont caractérisées par Western Blot après électrophorèse sur gel SDS-PAGE.

(i) Quantité de PSA contenu dans les éluats

La quantité de PSA dans chaque fraction acide ou basique est déterminée par une méthode ELISA utilisant un anticorps polyclonal anti-PSA afin de s'assurer que le PSA sera dosé dans sa totalité.

Dans le tableau 1 ci-après, on donne les résultats obtenus avec 3 anticorps particuliers, spécifiques de la forme libre du PSA, obtenus à l'exemple 2.

TABLEAU 1

Dosage du PSA immunopurifié avec les anticorps monoclonaux anti-PSA (fractions "élutions acides" et "élutions basiques")

Anticorps monoclonaux	ELUTION ACIDE			ELUTION BASIQUE		
	Concentration (µg/ml)	Volume fraction (ml)	Quantité PSA éluee (µg)	Concentration (µg/ml)	Volume fraction (ml)	Quantité PSA éluee (µg)
1	0,289	3,6	1,0	0,003	9,5	0,0
2	0,412	7,1	2,9	0,001	10,0	0,0
3	0,593	5,1	3,0	0,006	9,4	0,1
Surnageant cellulaire de départ	0,061	380,0	23,2			

Les résultats du tableau 1 montrent que le PSA est retrouvé exclusivement dans les fractions "élutions acides", et que tous les anticorps monoclonaux n'ont pas retenu la même quantité de PSA.

(ii) Activité enzymatique spécifique du PSA purifié à l'aide des anticorps

L'activité enzymatique du PSA contenu dans les fractions "élution acide" est mesurée sur un substrat de type chymotrypsine, S-2586 (MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA.HCl) obtenu chez Chromogenix AB (Mölndal, Suède). Cette activité est déterminée sur 60 µl d'échantillon, et l'activité spécifique est calculée à partir de la concentration déterminée dans le paragraphe précédent.

Les résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous.

TABLEAU 2

Activité enzymatique spécifique du PSA cellulaire immunopurifié

Anticorps monoclonaux	Activité spécifique du PSA (Δ DO/min/µg de PSA \times 1000)
1	21,6
2	1,2
3	0,9
Surnageant cellulaire de départ	11,6

Les résultats montrent que l'activité enzymatique spécifique de l'éluat acide obtenu avec l'anticorps anti-PSA n° 1 est deux fois plus élevée que l'activité du surnageant cellulaire de départ, avant immunopurification.

Cet anticorps a donc enrichi le PSA purifié en forme enzymatiquement active.

De plus, cet anticorps n° 1 reconnaît une forme libre du PSA. Par conséquent, l'anticorps n° 1 reconnaît essentiellement la forme libre active du PSA.

L'activité enzymatique spécifique des éluats acides obtenus avec les anticorps n° 2 et 3, est très faible. Cela montre que ces anticorps ont retenu essentiellement du PSA sous sa forme inactive. Comme ces anticorps sont spécifiques d'une forme libre du PSA, ils reconnaissent essentiellement le PSA sous sa forme libre inactive.

De plus, on sait que la trypsine est capable de transformer le PSA zymogène en PSA enzymatiquement actif. C'est pourquoi, afin de déterminer si le PSA zymogène avait été retenu, lors des opérations de chromatographie d'affinité décrites ci-dessus, par les anticorps monoclonaux anti-PSA, l'activité enzymatique des "éluates acides" a été mesurée en présence de trypsine. L'activité spécifique des éluats, déterminée avec ou sans trypsine, est identique. Par conséquent, les éluats acides obtenus avec les anticorps n° 1, 2

et 3, comme décrit ci-dessus, ne contiennent pas de PSA sous forme zymogène.

Donc aucun des anticorps 1, 2 ou 3 ne reconnaît la forme zymogène du PSA.

2) Immunoanalyse effectuée après électrophorèse sur gel SDS-PAGE :

5 Les différentes formes de PSA présentes dans les éluats issus des colonnes sur lesquelles sont fixés les anticorps n° 1, 2 et 3 ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions réductrices, et la détection du PSA par Western Blot est réalisée avec un anticorps monoclonal reconnaissant le PSA total.

10 Les Western Blot réalisés confirment que du PSA est présent dans tous les échantillons testés provenant de l'élution acide, dans des proportions en corrélation avec les quantités déterminées dans le tableau 1, alors que les échantillons provenant des élu-
tions basiques n'en contiennent pas.

15 Les Western Blot réalisés confirment également que les anticorps n° 1, 2 et 3 n'ont pas retenu le complexe PSA-ACT. Enfin, par comparaison avec le PSA obtenu comme indiqué à l'exemple 3 utilisé comme témoin, les éluations acides contiennent des formes de PSA ayant un poids moléculaire normal (33 kDa), et également des formes ayant un poids moléculaire inférieur.

REVENDICATIONS

1. Anticorps ou fragments d'anticorps qui se lient spécifiquement au PSA libre inactif, lesdits anticorps étant des anticorps polyclonaux purifiés ou des anticorps monoclonaux.
- 5 2. Anticorps ou fragments d'anticorps selon la revendication 1, qui sont des anticorps monoclonaux.
3. Hybridome produisant des anticorps monoclonaux tels que définis dans la revendication 2.
4. Réactif pour test immunologique contenant des anticorps ou fragments
10 d'anticorps tels que définis dans la revendication 1 ou 2.
5. Réactif pour test immunologique tel que défini dans la revendication 4, dans lequel lesdits anticorps ou fragments d'anticorps sont fixés sur un support et/ou sont liés à un marqueur.
6. Test immunologique pour la détermination quantitative du PSA libre
15 inactif, dans un échantillon biologique prélevé chez un sujet, dans lequel on met en contact ledit échantillon avec un réactif tel que défini dans la revendication 4 ou 5, et l'on évalue la quantité de PSA libre inactif lié auxdits anticorps ou fragments d'anticorps.
7. Test immunologique selon la revendication 6, dans lequel, en outre, on évalue la quantité d'une forme de PSA autre que la forme libre inactive, présente dans un
20 échantillon de même nature prélevé chez le même sujet.
8. Test immunologique selon la revendication 7, dans lequel ladite autre forme de PSA est choisie parmi le PSA libre actif, le PSA libre total, le PSA complexé et le PSA total.
9. Test immunologique selon la revendication 8, dans lequel ladite autre
25 forme est le PSA libre actif.
10. Test immunologique pour déterminer le rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre total,
 ou le rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre actif,
30 ou le rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA libre total,
 ou le rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA total,

ou le rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA complexé,

ou le rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA total,

ou le rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA complexé,

5 ou les inverses de ces rapports, ou des combinaisons de ces rapports, dans un échantillon biologique prélevé chez un sujet, dans lequel :

- on évalue la quantité de PSA libre inactif conformément à la revendication 6,

10 - on évalue l'une des quantités choisies parmi la quantité de PSA libre actif, la quantité de PSA libre total, la quantité de PSA total et la quantité de PSA complexé, sur un échantillon de même nature prélevé chez le même sujet,

et

15 - on détermine ledit rapport, ou ledit rapport inverse, ou ladite combinaison de rapports.

11. Méthode de diagnostic d'une pathologie bénigne de la prostate ou de différenciation entre une pathologie bénigne de la prostate et un adénocarcinome de la prostate chez un sujet, dans laquelle on mesure la teneur en PSA libre inactif dans un échantillon provenant dudit sujet.

20 12. Méthode selon la revendication 11, dans laquelle on met en œuvre un test immunologique tel que défini dans la revendication 6.

13. Méthode selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, dans laquelle, en outre, on compare ladite teneur à une échelle de valeurs prédéterminées, lesdites valeurs étant celles observées chez les patients affectés par une pathologie 25 bénigne de la prostate reconnue et celles observées chez les patients affectés par un adénocarcinome de la prostate reconnu, et l'on conclut du résultat de cette comparaison soit à la présence d'une pathologie bénigne de la prostate soit à la présence d'un adénocarcinome de la prostate.

14. Méthode de diagnostic d'un adénocarcinome de la prostate chez un sujet 30 soupçonné d'être atteint dudit adénocarcinome, sans pratiquer de biopsie, dans laquelle on met en œuvre un test immunologique tel que défini dans la revendication 10.

15. Méthode selon la revendication 14, dans laquelle, en outre, on compare la

valeur du rapport ainsi déterminée à une valeur-seuil prédéterminée choisie, selon le type de rapport utilisé, de façon que les valeurs dudit rapport supérieures ou, respectivement, inférieures, à ladite valeur-seuil soient représentatives des valeurs observées chez les patients affectés par un adénocarcinome de la prostate reconnu, et de façon qu'inversement les valeurs dudit rapport inférieures ou, respectivement, supérieures, à ladite valeur-seuil soient représentatives des valeurs observées chez des sujets reconnus comme n'étant pas affectés par un adénocarcinome de la prostate, et l'on conclut du résultat de ladite comparaison soit à la présence soit à l'absence d'un adénocarcinome de la prostate.

10 16. Méthode de diagnostic permettant de différencier entre une pathologie bénigne de la prostate et un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint par l'une de ces maladies, dans laquelle on met en œuvre un test immunologique tel que défini dans la revendication 10.

15 17. Méthode selon la revendication 16, dans laquelle, en outre, on compare la valeur du rapport ainsi déterminée à une valeur de différenciation prédéterminée choisie, selon le type de rapport utilisé, de façon que les valeurs dudit rapport qui sont supérieures ou, respectivement, inférieures, à ladite valeur de différenciation soient représentatives des valeurs observées chez les patients affectés par une pathologie bénigne de la prostate reconnue, et de façon qu'inversement les valeurs dudit rapport qui sont inférieures ou, respectivement, supérieures, à ladite valeur de différenciation soient représentatives des valeurs observées chez des sujets reconnus comme étant affectés par un adénocarcinome de la prostate reconnu, et l'on conclut du résultat de ladite comparaison soit à la présence d'une pathologie bénigne de la prostate soit à la présence d'un adénocarcinome de la prostate.

25 18. Méthode de diagnostic d'un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint dudit adénocarcinome, dans laquelle :

- on détermine la quantité de PSA libre actif et/ou la quantité de PSA libre inactif dans un échantillon prélevé chez ce sujet,
- le cas échéant, on détermine la quantité d'une forme de PSA autre que le PSA libre actif et autre que le PSA libre inactif dans un échantillon de même nature prélevé chez le même sujet,
- on détermine la valeur de l'un des rapports suivants :

- rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre actif,
- rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre total,
- 5 • rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA total,
- rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA complexé,
- 10 • rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA libre total,
- rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA total,
- rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA complexé,

- 15 ou les inverses de ces rapports, ou des combinaisons de ces rapports,
- on compare la valeur du rapport ainsi déterminée à une valeur-seuil prédéterminée choisie, selon le type de rapport utilisé, de façon que les valeurs dudit rapport supérieures ou, respectivement, inférieures, à ladite valeur-seuil soient représentatives des valeurs observées chez les patients affectés par un adénocarcinome de la prostate reconnu, et de façon qu'inversement les valeurs dudit rapport inférieures ou, respectivement, supérieures, à ladite valeur-seuil soient représentatives des valeurs observées chez des sujets reconnus comme n'étant pas affectés par un adénocarcinome de la prostate, et l'on conclut du résultat de ladite comparaison soit à la
- 20 présence soit à l'absence d'un adénocarcinome de la prostate.
- 25 19. Méthode de diagnostic permettant de différencier entre une pathologie bénigne de la prostate et un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint d'une de ces maladies, dans laquelle :

- 30 - on détermine la quantité de PSA libre actif et/ou la quantité de PSA libre inactif dans un échantillon prélevé chez ce sujet,
- le cas échéant, on détermine la quantité d'une forme de PSA autre que le PSA libre actif et autre que le PSA libre inactif dans un échantillon de

même nature prélevé chez le même sujet,

- on détermine la valeur de l'un des rapports suivants :

- rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre actif,
- 5 • rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA libre total,
- rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA total,
- 10 • rapport de la quantité de PSA libre inactif à la quantité de PSA complexé,
- rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA libre total,
- rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA total,
- 15 • rapport de la quantité de PSA libre actif à la quantité de PSA complexé,

ou les inverses de ces rapports, ou des combinaisons de ces rapports,

- on compare la valeur du rapport ainsi déterminée à une valeur de différenciation prédéterminée choisie, selon le type de rapport utilisé, de façon que les valeurs dudit rapport qui sont supérieures ou, respectivement, inférieures, à ladite valeur de différenciation soient représentatives des valeurs observées chez les patients affectés par une pathologie bénigne de la prostate reconnue, et de façon qu'inversement les valeurs dudit rapport qui sont inférieures ou, respectivement, supérieures, à ladite valeur de différenciation soient représentatives des valeurs observées chez des sujets reconnus comme étant affectés par un adénocarcinome de la prostate reconnu, et l'on conclut du résultat de ladite comparaison soit à la présence d'une pathologie bénigne de la prostate soit à la présence d'un adénocarcinome de la prostate.

30

20. Kit de diagnostic permettant de diagnostiquer un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint dudit adénocarcinome, ou permettant de

différencier entre une pathologie bénigne de la prostate et un adénocarcinome de la prostate chez un sujet soupçonné d'être atteint par l'une de ces maladies, ledit kit comprenant :

- 5 - des moyens pour doser le PSA libre inactif dans un échantillon biologique, et/ou
- des moyens pour doser le PSA libre actif dans un échantillon biologique de même nature, et éventuellement
- des moyens pour doser une forme de PSA autre que le PSA libre inactif et autre que le PSA libre actif dans un échantillon biologique de même nature.
- 10 21. Kit selon la revendication 20, dans lequel lesdits moyens sont des anticorps.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Ir. .ational Application No
PCT/FR 01/01094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/30 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 49323 A (HYBRITECH INCORPORATED) 5 November 1998 (1998-11-05) page 4, line 13 -page 5, line 20; claims 1-44	1-21
X	----- MICHEL SANDRINE ET AL: "Anti-free prostate-specific antigen monoclonal antibody epitopes defined by mimotopes and molecular modeling." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 45, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 638-650, XP002175112 ISSN: 0009-9147 the whole document	1-6
A	----- US 5 994 085 A (CANTOR) 30 November 1999 (1999-11-30) claims 1-11 ----- -/-	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 2001

Date of mailing of the international search report

29/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01094

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 635 575 A (WALLAC OY) 25 January 1995 (1995-01-25) column 2, line 29 - line 35; claims 1-6	1-21
A	US 5 501 983 A (LILJA ET AL.) 26 March 1996 (1996-03-26) claims 1-20	1-21
A	COREY EVA ET AL: "LNCaP produces both putative zymogen and inactive, free form of prostate-specific antigen." PROSTATE, vol. 35, no. 2, May 1998 (1998-05), pages 135-143, XP000981985 ISSN: 0270-4137 the whole document	1-21
A	FR 2 780 791 A (BIO MERIEUX SA) 7 January 2000 (2000-01-07) claims 1-17	1-21
P, X	LAFFIN, ROBERT J. ET AL: "Hybritech total and free prostate-specific antigen assays developed for the Beckman Coulter Access automated chemiluminescent immunoassay system: a multicenter evaluation of analytical performance" CLIN. CHEM. (WASHINGTON, D. C.) (2001), 47(1), 129-132 , XP002175113 the whole document	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/01094

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9849323	A	05-11-1998	AU 7166898 A EP 0981629 A	24-11-1998 01-03-2000
US 5994085	A	30-11-1999	EP 1053475 A WO 9910745 A	22-11-2000 04-03-1999
EP 0635575	A	25-01-1995	CA 2128285 A JP 7179499 A	23-01-1995 18-07-1995
US 5501983	A	26-03-1996	DE 9117047 U DE 69117292 D DE 69117292 T DE 540573 T EP 0540573 A GR 3019888 T JP 6502719 T AT 134448 T DK 540573 T ES 2070107 T WO 9201936 A JP 2669566 B US 5939533 A US 5912158 A	18-05-1995 28-03-1996 18-07-1996 28-09-1995 12-05-1993 31-08-1996 24-03-1994 15-03-1996 09-04-1996 01-06-1995 06-02-1992 29-10-1997 17-08-1999 15-06-1999
FR 2780791	A	07-01-2000	AU 4623599 A EP 1095276 A WO 0002052 A	24-01-2000 02-05-2001 13-01-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D nde internationale No
PCT/FR 01/01094

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K16/30 G01N33/574

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C07K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 49323 A (HYBRITECH INCORPORATED) 5 novembre 1998 (1998-11-05) page 4, ligne 13 -page 5, ligne 20; revendications 1-44	1-21
X	MICHEL SANDRINE ET AL: "Anti-free prostate-specific antigen monoclonal antibody epitopes defined by mimotopes and molecular modeling." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 45, no. 5, mai 1999 (1999-05), pages 638-650, XP002175112 ISSN: 0009-9147 le document en entier	1-6
A	US 5 994 085 A (CANTOR) 30 novembre 1999 (1999-11-30) revendications 1-11	1-21
-/-		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 août 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/08/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. nde internationale No

PCT/FR 01/01094

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 635 575 A (WALLAC OY) 25 janvier 1995 (1995-01-25) colonne 2, ligne 29 - ligne 35; revendications 1-6 ---	1-21
A	US 5 501 983 A (LILJA ET AL.) 26 mars 1996 (1996-03-26) revendications 1-20 ---	1-21
A	COREY EVA ET AL: "LNCaP produces both putative zymogen and inactive, free form of prostate-specific antigen." PROSTATE, vol. 35, no. 2, mai 1998 (1998-05), pages 135-143, XP000981985 ISSN: 0270-4137 le document en entier ---	1-21
A	FR 2 780 791 A (BIO MERIEUX SA) 7 janvier 2000 (2000-01-07) revendications 1-17 ---	1-21
P,X	LAFFIN, ROBERT J. ET AL: "Hybritech total and free prostate-specific antigen assays developed for the Beckman Coulter Access automated chemiluminescent immunoassay system: a multicenter evaluation of analytical performance" CLIN. CHEM. (WASHINGTON, D. C.) (2001), 47(1), 129-132 , XP002175113 le document en entier -----	1-21

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

D n° de l'annexe internationale No

PCT/FR 01/01094

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9849323 A	05-11-1998	AU 7166898 A EP 0981629 A	24-11-1998 01-03-2000
US 5994085 A	30-11-1999	EP 1053475 A WO 9910745 A	22-11-2000 04-03-1999
EP 0635575 A	25-01-1995	CA 2128285 A JP 7179499 A	23-01-1995 18-07-1995
US 5501983 A	26-03-1996	DE 9117047 U DE 69117292 D DE 69117292 T DE 540573 T EP 0540573 A GR 3019888 T JP 6502719 T AT 134448 T DK 540573 T ES 2070107 T WO 9201936 A JP 2669566 B US 5939533 A US 5912158 A	18-05-1995 28-03-1996 18-07-1996 28-09-1995 12-05-1993 31-08-1996 24-03-1994 15-03-1996 09-04-1996 01-06-1995 06-02-1992 29-10-1997 17-08-1999 15-06-1999
FR 2780791 A	07-01-2000	AU 4623599 A EP 1095276 A WO 0002052 A	24-01-2000 02-05-2001 13-01-2000